

## 明 細 書

### 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドの製造方法

#### 技術分野

- [0001] 本発明は、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドの製造方法、ならびに該方法によって製造される3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドから1, 3-プロパンジオール、3-ヒドロキシプロピオン酸、アクロレイン、アクリル酸及びアクリル酸エステルを製造する方法に関するものである。特に、本発明は、高純度でかつ効率よく3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを製造できる方法、ならびに当該3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドから高純度でかつ効率よく1, 3-プロパンジオール、3-ヒドロキシプロピオン酸、アクロレイン、アクリル酸及びアクリル酸エステルを製造できる方法に関するものである。

#### 背景技術

- [0002] 1, 3-プロパンジオールは、ポリエステル及びポリウレタンの製造に使用されるモノマーとしてならびに環状化合物の合成用出発材料としてなど、広範な用途を有する有用な化合物である。
- [0003] 1, 3-プロパンジオールの合成方法としては、従来、化学合成による方法および発酵による方法双方が公知である。前者の方法としては、例えば、エチレンオキシドをロジウム触媒を用いてカルボニル化して、1, 3-プロパンジオールを製造する方法(例えば、US-A-4, 873, 378、US-A-4, 873, 379及びUS-A-4, 935, 554)や3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを還元して、1, 3-プロパンジオールを製造する方法(例えば、US-A-2, 434, 110)などが知られている。
- [0004] しかしながら、上記化学合成による方法は、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドへの転化率及び選択率が不十分であり、副生成物を除去するための精製工程を必要とし、経済的に好ましくない。加えて、また、原料としての3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドが副生成物を含む場合には、次工程の1, 3-プロパンジオールの製造工程で二次生成物がさらに副生する場合があります。二次生成物の種類によっては、精製が困難になったり、その後この1, 3-プロパンジオールを原料として用いて繊維を製造した際に繊維等の製品に変色や重合不良をもたらす原因になる恐れがある。このため、1

、3-プロパンジオールの製造における原料として使用される3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドにおける副生成物含量は可能な限り少ないことが望ましい。

[0005] また、後者の方法は、シトロバクター(Citrobacter)、クロストリジウム(Clostridium)、エンテロバクター(Enterobacter)、イリオバクター(Ilyobacter)、クレブシエラ(Klebsiella)、ラクトバチルス(Lactobacillus)、およびペロバクター(Pelobacter)等の1, 3-プロパンジオール産生菌を用いて、グリセリン及びグルコースの発酵から1, 3-プロパンジオールを製造する方法である。この方法は、脱水酵素によりグリセリンを3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド(3-HPA)および水に転換する段階及び $\text{NAD}^+$ -リンカー酸化還元酵素により3-HPAを1, 3-プロパンジオールに還元する段階の2段階反応からなる。また、所望の1, 3-プロパンジオールの収率を上げるために、遺伝子組換え微生物を用いて、グリセリンから1, 3-プロパンジオールを製造する方法が開示されている(例えば、WO 98/21339、WO 99/58686、US-A-6, 025, 184及びWO 01/12833)。

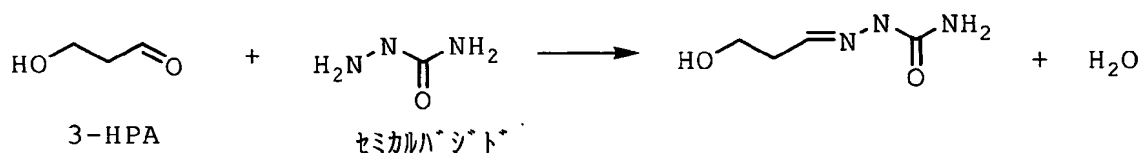
[0006] しかしながら、上記発酵による製造方法では、上記反応のうち、後段の反応で必要なNADHを得るために、上記2段階反応とジヒドロキシアセトンに脱水素してNADHを生じる反応が同時に起こることが知られている。このため、上記一般的な発酵によるグリセリンから1, 3-プロパンジオールへの転化率は最大でも50%程度と低くなり、3-HPAの収率が十分ではないという問題がある。このような問題を解消するために、遺伝子組換え微生物を用いた1, 3-プロパンジオールの製造も報告されているが、このような微生物を用いたとしても、上記と同様の理由によりグリセリンから3-HPAへの反応に加えてNADHの生成反応が生じる必要があるため、高い転化率を達成することはきわめて困難である。さらに、発酵培養液には、一般的に、培養液中に含まれる栄養素や他の微生物産物などの、多くの副生成物を含む。このため、発酵を用いた方法では、化学合成による以上に精製工程が複雑になり、やはり経済的に好ましくない。上記問題に加えて、上記発酵による方法では、目的産物である1, 3-プロパンジオールの精製工程において、シクロヘキサン等の有機溶剤が使用される場合が多いが、環境を考慮するとこのような有機溶剤の後処理がさらに必要であるという問題もある。

[0007] 一方、上記方法の中間体である、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドは、上記したような1, 3-プロパンジオールに加えて、3-ヒドロキシプロピオン酸、アクロレイン、アクリル酸及びアクリル酸エステルを製造する際の中間体としても使用できる。これらの生成物のうち、例えば、アクリル酸は、アクリル繊維共重合体用、あるいはエマルジョンとして粘接着剤に用いられる他、塗料、繊維加工、皮革、建築用材等として広範な用途を有する。アクリル酸の製造方法は、従来公知であり、一般的にプロピレンからアクロレイン、アクロレインからアクリル酸という2段気相接触酸化によって製造される。この際中間材料として使用されるアクロレインは、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを酸性条件下にすることによっても製造される。このため、アクリル酸を高純度でかつ安価に製造するために、アクロレイン、さらには3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを高純度にかつ効率よく製造することが好ましい。

[0008] 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド(3-HPA)を製造する方法としては、ジオールデヒドラターゼおよび／またはグリセロールデヒドラターゼを、ジオールデヒドラターゼ再活性化因子および／またはグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子と組み合わせてクローニングした組換え菌体を用いて、グリセロールから3-HPAを製造する方法(例えば、Journal of Bacteriology, Vol.181, No.13, pp.4110-4113, 1999; The Journal of Biological Chemistry, Vol.272, No.51, pp.32034-32041, 1997; Arch. Microbiol., 174:81-88 (2000); The Journal of Biological Chemistry, Vol.274, No.6, pp.3372-3377, 1999)、及びKlebsiella pneumoniaeを、グリセリンリッチな培地中で培養した後、セミカルバジド及びグリセリンを含む緩衝液中に懸濁することによってグリセリンを3-HPAに変換する方法(Applied and Environmental Microbiology, Vol.50, No.6, pp.1444-1450, 1985)が報告されている。しかしながら、上記方法のうち、組換え菌体を用いてグリセリンから3-HPAを製造する方法はすべて、反応初期の挙動を学問的に検討したものであり、工業的観点からの上記グリセリンから3-HPAへの変換反応の特定反応条件については検討の余地があった。また、後者の方法では、セミカルバジドの存在により3-HPAの蓄積が促進され、最大83%程度の収率が達成されるものの、3-HPAの回収をセミカルバジドの存在下で行なうと、下記反応式に示されるように3-HPAがセミカルバジドと複合体を形成し、この複合体から3-HPA

を再度回収することは不可能であるため、上記方法によっては3-HPA単体を得ることはできない。

[0009] [化1]



## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

[0010] したがって、本発明の目的は、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド(3-HPA)を工業的レベルの高い転化率(即ち、高い収率)で製造するための特定条件を提供することである。

[0011] 本発明の他の目的は、上記3-HPAから効率よく1, 3-プロパンジオールを製造する方法を提供することである。

[0012] 本発明のさらなる他の目的は、上記3-HPAから効率よく3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド酸を製造する方法を提供することである。

[0013] 本発明の別の目的は、上記3-HPAから高純度でかつ高い収率で、アクロレイン、アクリル酸及びアクリル酸エステルを製造する方法を提供することである。

### 課題を解決するための手段

[0014] 触媒として作用する酵素活性(量)と基質濃度とが転化率に大きな影響を及ぼすことは、一般に良く知られている。本発明者らは、上記を考慮して上記目的を達成するためにグリセリンから3-HPAへの変換について鋭意検討を行なった結果、特に上記変換反応においては、触媒活性と基質濃度には非常に強い相関関係があることを知得した。さらにこの知見によってジオールデヒドラターゼおよび/またはグリセロールデヒドラターゼ(本明細書中では、一括して「ジオール/グリセロールデヒドラターゼ」、または単に「デヒドラターゼ」とも称する)ならびにジオールデヒドラターゼ再活性化因子および/またはグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子(本明細書中では、一括して「ジオール/グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子」、または単に「デヒドラ

ターゼ再活性化因子」とも称する)を有する菌体やトルエン処理菌体や固定化菌体を用いたグリセリンから3-HPAへの変換について鋭意検討を行なった結果、グリセリン濃度 $[Y(g/100ml)]$ を二乗したもので触媒量 $[X(U/g \text{グリセリン})]$ を割った値 $(X/Y^2)$ を特定の範囲内になるように触媒量を制御して、デヒドラターゼを作用させると、工業的レベルの高い転化率、特に約70%以上の転化率が達成でき、3-HPAを高い収率で製造できることを見出した。また、本発明者らは、特に菌体処理物を使用する場合には、栄養素などのグリセリン以外の他の成分をほとんど使用しないため、濾過等によって菌体処理物を除去することによって容易に3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを高純度で製造できることを見出した。さらに、このようにして得られた3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを水素添加することによって、所望の1,3-プロパンジオールが高純度でかつ高収率で製造できることを知得した。

[0015] また、本発明者らは、上記したようにしてほとんど副生成物を含まずに得られた3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを酸性条件下で反応させることによって、アクロレインが得られるが、このアクロレインも、出発原料に副生成物がほとんど含んでいないため、高純度で製造でき、ゆえにこのアクロレインからアクリル酸が高純度で製造できることも知得した。加えて、本発明者らは、アクロレインの酸化的エステル化を行なうことによって、アクリル酸エステルが高純度で製造できることも知得した。

[0016] すなわち、上記目的は、ジオールデヒドラターゼおよび／またはグリセロールデヒドラターゼの触媒量 $[X(U/g \text{グリセリン})]$ をグリセリン濃度 $[Y(g/100ml)]$ の二乗で割った値 $(X/Y^2)$ が10～8,000である条件下で、ジオールデヒドラターゼおよび／またはグリセロールデヒドラターゼならびに必要であればジオールデヒドラターゼ再活性化因子および／またはグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子を含んでなる菌体および／または菌体処理物を用いて、グリセリンを脱水して3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを製造する段階を有する3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドの製造方法によって達成される。

[0017] 上記他の目的は、上記方法によって製造される3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを水素添加して、1,3-プロパンジオールを製造する段階を有する、1,3-プロパンジオールの製造方法によって達成される。

[0018] 上記さらなる他の目的は、上記方法によって製造される3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを酸化して、3-ヒドロキシプロピオン酸を製造する段階を有する、3-ヒドロキシプロピオン酸の製造方法によって達成される。

[0019] 上記別の目的は、上記方法によって製造される3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを含む反応生成物から菌体および／または菌体処理物を除去した後、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを酸性条件下で反応して、アクロレインを製造する段階を有する、アクロレインの製造方法；上記方法によって製造されるアクロレインを酸化してアクリル酸を製造する段階を有する、アクリル酸の製造方法；および上記方法によって製造されるアクロレインを酸化的エステル化してアクリル酸エステルを製造する段階を有する、アクリル酸エステルの製造方法によって達成される。

#### 発明を実施するための最良の形態

[0020] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0021] 本発明の第一は、ジオールデヒドラターゼおよび／またはグリセロールデヒドラターゼの触媒量 $[X(\text{U/gグリセリン})]$ をグリセリン濃度 $[Y(\text{g/100ml})]$ の二乗で割った値 $(X/Y^2)$ が $10 \sim 8,000$ である条件下で、ジオールデヒドラターゼおよび／またはグリセロールデヒドラターゼならびに必要であればジオールデヒドラターゼ再活性化因子および／またはグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子を含んでなる菌体および／または菌体処理物を用いて、グリセリンを脱水して3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを製造する段階を有する3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドの製造方法に関するものである。これは、グリセリンから3-HPAへの転化率に作用すると考えられる大きな要因のうち、特に触媒量が転化率に大きな影響を及ぼし、グリセリン濃度 $[Y(\text{g/100ml})]$ を二乗したもので触媒量 $[X(\text{U/gグリセリン})]$ を割った値 $(X/Y^2)$ を $10 \sim 8,000$ という特定範囲に含まれるような量でデヒドラターゼをグリセリンに作用させると、上記背景技術で述べたようなグリセリンをNADHに変換するなどの望ましくない反応等は起こらず、グリセリンは3-HPAへの変換反応で選択的に利用されるため、80%以上という高い転化率でグリセリンを3-HPAに変換できることが判明した。また、グリセリンから3-HPAへの変換反応が優先的に起こり、製造される3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドは副生成物をほとんど含まないため、菌体／菌体処理物を分離・

除去するという簡単な操作によって、高純度で製造できる。

- [0022] 本発明において、ジオールデヒドラターゼおよび／またはグリセロールデヒドラターゼの触媒量 $[X(\text{U/gグリセリン})]$ をグリセリン濃度 $[Y(\text{g/100ml})]$ の二乗で割った値 $(X/Y^2)$ は、 $10\sim 8,000$ である。この際、 $X/Y^2$ が上記範囲内であれば、高い転化率、例えば、70%以上の転化率が達成できるが、逆に上記範囲を外れると、グリセリンから3-HPAへの転化率が著しく低下してしまう。上記 $X/Y^2$ の下限は、15、25、50、55、85、90の順で好ましく、また、上記 $X/Y^2$ の上限は、7,000、6,500、5,500、5,000の順で好ましい。
- [0023] 本明細書において、「グリセリン濃度 $[Y(\text{g/100ml})]$ 」とは、100mlの溶液中に含まれるグリセリンの重量を表わすものである。例えば、1Mのグリセリンを含む50mMのリン酸カリウムバッファー(pH8) 1L中には92gのグリセリンが含まれるため、この場合のグリセリン濃度(Y)は、9.2(g/100ml)となる。
- [0024] また、本明細書において、「触媒量 $[X(\text{U/gグリセリン})]$ 」とは、ジオール／グリセロールデヒドラターゼ酵素の単位(U)をグリセリンの重量(g)で除した値を意味する。この際、酵素の単位の「1U」とは、ジオール／グリセロールデヒドラターゼ酵素活性を示す菌体および／または菌体処理物が1分間あたり $1\mu\text{mol}$ のグリセリンを3-HPAに変換できる能力を意味し、ジオール／グリセロールデヒドラターゼ酵素活性を示す菌体および／または菌体処理物が1分間あたり $1\mu\text{mol}$ の1,2-プロパンジオールをプロピオンアルデヒドに変換できる能力に相当する。なお、本発明においては、プロピオンアルデヒド、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドの生成は、3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン塩酸塩を用いて検出する方法を用いて検出した。例えば、1Mのグリセリンを含む50mMのリン酸カリウムバッファー(pH8) 1Lに、200Uの活性を持つトルエン処理菌体を入れると、触媒量(X)は、 $2.17(\text{U/gグリセリン}) (=200/92)$ となる。
- [0025] 本発明において、グリセリン濃度(Y)は、特に制限されず、反応液の粘度、酵素の添加量、酵素の種類や活性の強さ、反応後の濃縮・精製工程などによって適宜選択できる。グリセリン濃度(Y)の下限は、好ましくは、溶液100ml当たり、0.5g以上、より好ましくは1g以上、最も好ましくは2g以上となるような濃度である。また、グリセリン

濃度(Y)の上限は、好ましくは、溶液100ml当たり、60g以下、より好ましくは50g以下、最も好ましくは40g以下となるような濃度である。この際、グリセリン濃度が0.5g/100ml未満であると、溶液中のグリセリン量が少なすぎて、生成する3-HPAの量も少なく、工業上の観点から経済的でない可能性がある。これに対して、グリセリン濃度が60g/100mlを超えると、反応液の粘度が上がり、菌体/菌体処理物と均一に混合しにくくなり、グリセリンがジオールデヒドラターゼ/グリセロールデヒドラターゼの作用を効率よく受けることができない可能性がある。

[0026] 本発明において、ジオールデヒドラターゼ及びグリセロールデヒドラターゼを始めとするデヒドラターゼは、上記したように、補酵素B12に依存型であり、グリセリンの3-HPAへの変換には補酵素B12の存在が必須である。グリセリンの3-HPAへの変換における補酵素B12の存在量は、グリセリンの3-HPAへの変換が十分進行する量であれば特に制限されず、基質濃度などによって異なる。補酵素B12の存在量は、基質濃度50mMあたり、補酵素B12濃度が1-1000  $\mu$  M、より好ましくは10-800  $\mu$  Mとなるような量であることが好ましい。また、菌体および/または菌体処理物の量は、酵素の触媒量が $X/Y^2 = 10-8,000$ を満たし、グリセリンの3-HPAへの変換が十分進行する量であれば特に制限されず、使用される菌体および/または菌体処理物の形態(菌体、固定化菌体及び固定化因子)、ならびにこれらの源、基質(グリセリン)濃度及び反応液量などによって異なる。例えば、菌体および/または菌体処理物は、回分式で使用されてもあるいは流通反応により使用されてもよいが、固定化菌体を流通反応により使用する場合には、菌体および/または菌体処理物の量は、使用される微生物の種類、酵素の寿命や反応液の流速(LHSV)などによって異なり、また、グリセリンの3-HPAへの変換が十分進行する量であれば特に制限されないが、回分式の場合の量に比べておよそ10-100倍量が通常、使用される。酵素の触媒量(X)の下限は、上記 $X/Y^2$ 及びYの好ましい値などから容易に算出できるが、例えば、1gグリセリン当たり、2.5U以上が好ましい。同様に、酵素の触媒量(X)の上限もまた、上記 $X/Y^2$ 及びYの好ましい値などから容易に算出できるが、例えば、1gグリセリン当たり、27,000,000U以下が好ましい。この際、酵素の触媒量が2.5U/gグリセリン未満である場合には、グリセリンへの酵素の作用が十分でなく、所



望の3-HPAの収率が十分でない可能性がある。これに対して、この際、酵素の触媒量が28, 800, 000U/gグリセリンを超えても、酵素の添加に見合う効果が得られず、経済的に好ましくない場合がある。なお、上記酵素の単位は、ジオール/グリセロールデヒドラターゼ酵素活性を示す菌体および/または菌体処理物が1分間あたり1  $\mu$ molの1, 2-プロパンジオールをプロピオンアルデヒドに変換できる能力を、「1U」と定義し、その測定方法は、1, 2-プロパンジオールからのプロピオンアルデヒドの生成が検出可能な方法であれば特に制限されずに使用できる。なお、本発明においては、プロピオンアルデヒド、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドの生成は、3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン塩酸塩を用いて検出する方法を用いて検出した。

[0027] 本発明において、「ジオール/グリセロールデヒドラターゼ」または「デヒドラターゼ」とは、グリセリンを脱水して、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド(本明細書中では、「3-HPA」とも称する)及び水に変換する触媒作用を有する酵素であり、このような作用を有するものであれば、特に制限されることなく、公知のものが使用できる。これらのうち、酵素の寿命を考慮すると、グリセロールデヒドラターゼが好ましく使用される。

[0028] 本発明において、グリセロールデヒドラターゼは、特に制限されることなく、この酵素を有する/発現するいずれの源由来であってもよい。具体的には、Klebsiella属、Citrobacter属、Clostridium属、Lactobacillus属、Enterobacter属、Caloramator属、Salmonella属及びListeria属に属する微生物があり、より詳しくは、Klebsiella pneumoniae、Citrobacter pneumoniae、Clostridium pasteurianum、Lactobacillus leichmannii、Citrobacter intermedium、Lactobacillus reuteri、Lactobacillus buchneri、Lactobacillus brevis、Enterobacter agglomerans、Clostridium butyricum、Caloramator viterbensis、Lactobacillus collinoides、Lactobacillus hilgardii、Salmonella typhimurium、Listeria monocytogenes、及びListeria innocua由来のグリセロールデヒドラターゼなどが挙げられる。これらのグリセロールデヒドラターゼは、単独で使用されてもあるいは2以上の混合物として使用されてもあるいは下記に詳述されるジオールデヒドラターゼと組み合わせて使用されてもよい。

[0029] 上記源からグリセロールデヒドラターゼを単離する方法は、特に制限されることなく、抽出、カラムクロマトグラフィー等の、公知の酵素の分離・単離方法と同様にして、上

記したようないずれかの微生物から単離できる。

[0030] また、本発明において、ジオールデヒドラターゼもまた、特に制限されることなく、この酵素を有する／発現するいずれの源由来であってもよい。具体的には、Klebsiella 属、Propionibacterium 属、Clostridium 属、Lactobacillus 属、Salmonella 属、Citrobacter 属、Flavobacterium 属、Acetobacterium 属、Brucella 属、及び Fusobacterium 属に属する微生物があり、より詳しくは、Klebsiella pneumoniae、Propionibacterium freudenreichii、Clostridium glycolicum、Lactobacillus brevis、Salmonella typhimurium、Citrobacter freundii、Lactobacillus buchneri、Brucella melitensis、Fusobacterium nucleatum、Klebsiella oxytoca、Propionibacterium freudenreichii、Salmonella typhimurium、Listeria monocytogenes、及び Listeria innocua 由来のジオールデヒドラターゼなどが挙げられる。これらのジオールデヒドラターゼは、単独で使用されてもあるいは2以上の混合物として使用されてもあるいは上記グリセロールデヒドラターゼと組み合わせて使用されてもよい。

[0031] 上記源からジオールデヒドラターゼを単離する方法は、特に制限されることなく、抽出、カラムクロマトグラフィー等の、公知の酵素の分離・単離方法と同様にして、上記したようないずれかの微生物から単離できる。

[0032] 本発明による菌体および／または菌体処理物は、ジオール／グリセロールデヒドラターゼに加えて、ジオール／グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子を含んでもよい。この際、グリセリン→3-HPAへの転化率や酵素の再活性化を考慮すると、ジオール／グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子を有する菌体および／または菌体処理物を使用することが好ましい。

[0033] 本発明において、「ジオール／グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子」または「デヒドラターゼ再活性化因子」とは、グリセリン→3-HPA + H<sub>2</sub>Oの反応を触媒して失活したデヒドラターゼの活性を再度促す(再活性化する)因子を意味する。より詳細には、デヒドラターゼが触媒するグリセリン→3-HPA + H<sub>2</sub>Oの反応には、補酵素B12が関与しているが、デヒドラターゼは、グリセリン→3-HPA + H<sub>2</sub>Oの反応を展開・触媒すると、補酵素B12がつぶれて、活性中心が失活してしまうが、ここでデヒドラターゼ再活性化因子がつぶれた補酵素B12を新たな補酵素B12と置換して、デヒドラタ

ーゼの活性を再度促して(再活性化して)、デヒドラーゼをグリセリンの脱水反応に再使用できるようにする。このようにデヒドラーゼを再活性化する作用を有するものを、本発明においては、「ジオール／グリセロールデヒドラーゼ再活性化因子」または「デヒドラーゼ再活性化因子」と称する。このデヒドラーゼ再活性化因子は、上記したような作用を有するものであれば、特に制限されることなく、公知の、不活化したグリセロールデヒドラーゼを活性化するグリセロールデヒドラーゼ再活性化因子及び不活化したジオールデヒドラーゼを活性化するジオールデヒドラーゼ再活性化因子が使用される。なお、デヒドラーゼ及びデヒドラーゼ再活性化因子は、上記したもののいずれの組み合わせで使用されてもよい。好ましくは、デヒドラーゼ再活性化因子は、ジオールデヒドラーゼ再活性化因子および／またはグリセロールデヒドラーゼ再活性化因子のラージサブユニットならびにジオールデヒドラーゼ再活性化因子および／またはグリセロールデヒドラーゼ再活性化因子のスモールサブユニットから構成され、より好ましくは、ジオールデヒドラーゼ再活性化因子のラージサブユニットならびにジオールデヒドラーゼ再活性化因子および／またはグリセロールデヒドラーゼ再活性化因子のスモールサブユニットから構成され、特に好ましくはジオールデヒドラーゼ再活性化因子のラージサブユニット及びジオールデヒドラーゼ再活性化因子のスモールサブユニットから構成される。この際、ジオールデヒドラーゼ再活性化因子のラージサブユニットとしては、ddrA (NCBI No. AF017781) などがあり、また、グリセロールデヒドラーゼ再活性化因子のラージサブユニットとしては、gdrA (NCBI No. U30903) などがあるが、これらの限定されるものではない。ジオールデヒドラーゼ再活性化因子のスモールサブユニットとしては、ddrB (NCBI No. AF017781) などがあり、また、および／またはグリセロールデヒドラーゼ再活性化因子のスモールサブユニットgdrB (NCBI No. U30903) などがあるが、これらの限定されるものではない。これらの再活性化因子は、単独で使用されてもあるいは2以上の混合物として使用されてもよい。また、ラージサブユニット及びスモールサブユニットの順序は、特に制限されず、ラージサブユニット及びスモールサブユニットの順またはスモールサブユニット及びラージサブユニットの順、さらにはこれらが複数個ずつ存在する場合には、ブロック状あるいはランダム状に存在してもい

ずれもよいが、高い再活性化能という観点からは、スモールサブユニットの上流にラージサブユニットが存在することが好ましい。

[0034] 本発明において、グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子は、その源は特に制限されることなく、上記したようなグリセロールデヒドラターゼを有する微生物のゲノム上にコードされており、ラージサブユニット及びスモールサブユニットから構成されている。具体的には、*Lactobacillus*属、*Klebsiella*属、*Citrobacter*属、*Clostridium*属、及び *Enterobacter*属に属する微生物由来のグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子があり、より詳しくは、*Lactobacillus* sp.、*Klebsiella pneumoniae*、*Lactobacillus leichmannii*、*Citrobacter freundii*、*Citrobacter intermedium*、*Lactobacillus reuteri*、*Lactobacillus buchneri*、*Lactobacillus brevis*、*Clostridium pasteurianum*、*Enterobacter agglomerans*、及び *Clostridium butyricum*などが挙げられる。これらのうち、*Lactobacillus*に属する微生物、例えば、*Lactobacillus* sp.、*Lactobacillus leichmannii*、*Lactobacillus reuteri*、*Lactobacillus buchneri*、*Lactobacillus brevis*由来のものが好ましく使用され、特に *Lactobacillus* sp. 及び *Lactobacillus reuteri* 由来のものが好ましく使用される。なお、グリセロールデヒドラターゼとグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子との源は、同一であってもあるいは異なるものであってもよい。

[0035] 上記源からグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子を単離する方法は、特に制限されることなく、抽出、カラムクロマトグラフィー等の、公知の酵素の分離・単離方法と同様にして、上記したようないずれかの微生物から単離できる。

[0036] また、本発明において、ジオールデヒドラターゼ再活性化因子は、その源は特に制限されることなく、上記したようなジオールデヒドラターゼを有する微生物ゲノム上にコードされており、ラージサブユニット及びスモールサブユニットから構成されている。なお、このジオールデヒドラターゼ再活性化因子は、グリセロールデヒドラターゼ及びジオールデヒドラターゼ双方を再活性化できるため、本発明においては好ましく使用される。具体的には、*Klebsiella*属、*Citrobacter*属、*Propionibacterium*属、*Lactobacillus*属、*Flavobacterium*属、及び *Acetobacterium*属に属する微生物由来のジオールデヒドラターゼ再活性化因子があり、より詳しくは、*Klebsiella pneumoniae*、*Citrobacter freundii*、*Propionibacterium freudenreichii*、*Lactobacillus brevis*、*Lactobacillus*

buchneri、Flavobacterium sp.、及びAcetobacterium sp.などが挙げられる。これらのうち、Lactobacillusに属する微生物、即ち、Lactobacillus brevis、Lactobacillus buchneri、特にLactobacillus brevis由来のジオールデヒドラターゼ再活性化因子が好ましく使用される。なお、ジオールデヒドラターゼとジオールデヒドラターゼ再活性化因子との源は、同一であってもあるいは異なるものであってもよいが、再活性化能が優れるという点で、ジオールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットが好ましく使用され、ゆえに、ジオールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットならびにグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子および／またはジオールデヒドラターゼ再活性化因子のスモールサブユニットの組み合わせが、より好ましく使用される。

- [0037] 上記源からジオールデヒドラターゼ再活性化因子を単離する方法は、特に制限されることなく、抽出、カラムクロマトグラフィー等の、公知の酵素の分離・単離方法と同様にして、上記したようないずれかの微生物から単離できる。
- [0038] または、デヒドラターゼおよび／またはデヒドラターゼ再活性化因子をコードする遺伝子を含む組換え微生物、ならびにデヒドラターゼおよび／またはデヒドラターゼ再活性化因子の活性が向上するように変異をかけられた微生物を、上記デヒドラターゼ／デヒドラターゼ再活性化因子を有する／発揮する微生物源として使用してもよい。このような組換え微生物は、公知の方法を用いることにより作製でき、例えば、デヒドラターゼを発現する微生物としては、具体的には、上記背景技術で記載された Journal of Bacteriology, Vol.181, No.13, pp.4110-4113, 1999; The Journal of Biological Chemistry, Vol.272, No.51, pp.32034-32041, 1997; Arch. Microbiol., 174:81-88 (2000); The Journal of Biological Chemistry, Vol.274, No.6, pp.3372-3377, 1999に開示されるものに加えて、WO 98/21339、WO 99/58686、WO 98/21341、US-A-6, 025, 184、WO 01/12833、WO 96/35795、WO 01/04324、FEMS Microbiology Letters 164 (1998) 21-28, Applied and Environmental Microbiology, Jan. 1998, p.98-105, Applied and Environmental Microbiology, Dec. 1991, p.3541-3546などに開示されるものがある。また、デヒドラターゼの活性が向上するように変異をかけられた微生物は、公知の方法を用いることに

より作製でき、例えば、デヒドラターゼ活性が向上した変異微生物としては、具体的には、WO 00/70057などに開示されるものがある。

[0039] 本発明において、ジオール／グリセロールデヒドラターゼならびに必要であればジオール／グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子を含んでなる菌体および／または菌体処理物を用いて、グリセリンを脱水して3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを製造する。この際、以下に詳述するが、非常に高い転化率を達成することができ、また、得られる3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドは副生成物が少ないという観点から、「菌体」及び「菌体処理物」は、グリセリンを微生物のエネルギー源として用いることがないことが好ましい。本発明では、菌体処理物がより好ましく使用される。これは、菌体処理物を使用すると、発酵以外の方法によりグリセリンから3-HPAへの変換が可能であり、高い転化率や低い副生成物含量が達成できるためである。

[0040] なお、本発明において、「菌体」は、ジオールデヒドラターゼおよび／またはグリセロールデヒドラターゼならびに必要であればジオールデヒドラターゼ再活性化因子および／またはグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子を有しかつグリセリンから3-HPAへの変換を行なうものであれば特に制限されず、本発明による反応後、適当な培地に戻した場合に、その菌体が増殖能を有するか否かは問題ではない。好ましくは、3-HPAがさらに別の反応に供されず、グリセリンを含む反応系において、発酵以外の方法によりグリセリンから3-HPAへの変換が可能であるもの、即ち、グリセリンの酸化及びグリセリンをエネルギー源にした増殖を行なわないものである。例えば、このような菌体としては、グリセリンから3-HPAへの変換能を有する菌体を好気性条件下で培養した菌体；当該菌体をNADHおよび／またはNADPHを産生しないような条件下で培養した菌体；および適当なホストヘジオール／グリセロールデヒドラターゼ形質およびジオール／グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子形質を導入した組換え菌体、より好ましくはジオールデヒドラターゼ／グリセロールデヒドラターゼを複数コピー有するように遺伝子操作されて、これらの酵素を高発現する菌体などが好ましく挙げられる。また、「発酵」とは、グリセリンから3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを得る反応系中で、同時に、グリセリンの酸化および／またはグリセリンをエネルギー源にした増殖および／またはグリセリンの酸化等を行なう微生物の活動を意味する。この

ため、本発明において、「発酵以外の方法」とは、グリセリンを含む本発明による反応系でグリセリンの脱水による3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドの生成と同時に、グリセリンの資化およびグリセリンをエネルギー源にした増殖およびグリセリンの酸化を伴わない反応方法を意味する。

- [0041] 本明細書において、「菌体処理物」とは、本発明の反応に使用しやすいように菌体に何らかの処理を行なったものを意味する。具体的には、菌体処理物の例としては、上記したようなデヒドラターゼの固定化物及びデヒドラターゼ再活性化因子の固定化物(例えば、固定化酵素);上記したようなデヒドラターゼ及びデヒドラターゼ再活性化因子を含む菌体をトルエン等の有機溶剤で処理したトルエン処理菌体;ならびに上記したようなデヒドラターゼ及びデヒドラターゼ再活性化因子を有する菌体の固定化菌体などが挙げられる。これらのうち、トルエン処理菌体及び固定化菌体が好ましく使用され、特にトルエン処理菌体が好ましい。因子の固定化物の製造における固定化方法は、特に制限されることなく、不溶性担体に因子を共有結合、イオン結合、吸着等によって結合させる方法;因子を相互に架橋させる方法;高分子の網目構造の内部に因子を包括する方法などの、公知の方法が使用される。
- [0042] また、固定化菌体の製造における固定化方法もまた、特に制限されることなく、上記したようなデヒドラターゼ及びデヒドラターゼ再活性化因子を有する微生物を不溶性担体に担持する方法;当該微生物をゲルマトリックスで吸収または包括して固定化する方法;内部空間に閉じ込める方法などの、公知の方法が使用される。
- [0043] さらに、トルエン処理菌体の製造方法もまた、特に制限されることなく、上記したようなデヒドラターゼ及びデヒドラターゼ再活性化因子を有する微生物に、トルエンを添加、攪拌することによって、酵素や因子は菌体外に出ない位の大きさの孔を細胞壁に形成する方法などの、公知の方法が使用される。上記方法においては、トルエン処理菌体を製造するのに、トルエンを使用したか、トルエンの代わりに、アセトン、ヘキサン、酢酸エチル等の有機溶剤を使用してもよい。これらのうち、トルエンが好ましく使用される。この際、上記有機溶剤の添加量は、菌体に対して、0.1〜10質量%、より好ましくは0.2〜5質量%である。また、トルエン処理菌体は、特に制限されず公知の方法によって調製できる。例えば、適当な条件で培養された菌体を、緩衝液に

懸濁し、この懸濁液にトルエンを適当な濃度、好ましくは最終濃度が1 (v/v) %となるように、ボルテックスミキサーなどで、所定時間、好ましくは訳5分間、激しく攪拌してトルエン処理を行ない、トルエン処理後の菌体を緩衝液で洗浄する方法が使用できる。上記方法において、緩衝液としては、制限されず公知の緩衝液が使用できるが、特に50mMリン酸カリウムバッファー(1M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  25ml及び1M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  100mlを混合して、pHを8に調節した後、この溶液25mlに水を加えて500mlにしたもの)が好ましく使用される。

- [0044] 本発明において、固定化菌体及び固定化因子は、どのような形態で使用されてもよく、具体的には、膜状、粒子状、ひも状、ひだ状などがある。操作の容易性などを考慮すると、ひも状及び粒子状が好ましく使用される。
- [0045] このように菌体および／または菌体処理物を使用することによって、デヒドラターゼ及びデヒドラターゼ再活性化因子を含む菌体および／または菌体処理物の安定化が図れる；特に菌体処理物を使用する際には、これらの連続反復使用が可能であるという利点に加えて、培養液を使用せずにグリセリンを3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドに簡便に変換できるので、所望の3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドの純度及び収率が向上できるという利点がある。
- [0046] 本発明において、グリセリンの3-HPAへの変換方法は、特に制限されず、因子、固定化菌体及び固定化因子を用いて従来公知の物質変換方法と同様の方法が使用できる。本発明によるグリセリンの3-HPAへの変換は、菌体および／または菌体処理物(例えば、トルエン処理菌体や固定化菌体など)を用いて行なわれるため、発酵法による場合とは異なり、得られる3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドは副生成物をほとんど含まず、さらにほとんどのグリセリンが反応に使用されるため、高い転化率が達成できる。また、従来の化学法に比しても、やはり原料は、ほとんどすべてがグリセリンであるため、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドへの転化率及び選択率が非常に高く、また、純度も高いので、副生成物を除去するための精製工程が簡便に行なうことができ、また、経済的に非常に有利である。
- [0047] 以下、本発明によるグリセリンの3-HPAへの変換の好ましい一実施態様を記載する。例えば、粒子状の固定化菌体および／または固定化因子を使用する場合には、



適当な緩衝液(例えば、リン酸カリウムバッファー)、上記したような適当量の補酵素B12、グリセリンなどを含む混合溶液中に、上記したような適当な酵素が存在するように、当該粒子を入れて、10〜90℃で、より好ましくは15〜85℃で、1〜360分間、好ましくは5〜120分間、攪拌することによって、3-HPAを形成する。このようにして生成した3-HPAは、粒子上の固定化菌体と混合した状態にあるが、濾過、限外濾過、沈降などの公知の方法によって、固定化菌体と容易に分離できる。または、粒子状の固定化菌体および／または固定化因子を充填したカラムに、適当な緩衝液(例えば、リン酸カリウムバッファー)、上記したような適当量の補酵素B12、グリセリンなどを含む混合溶液を、10〜90℃で、より好ましくは15〜85℃で、0.1〜50LHSVの流速で、好ましくは0.2〜40LHSVの流速で、流すことによって、3-HPAを形成してもよい。この際、グリセリンの濃度は、因子による作用を十分受けられ、ジオールデヒドラターゼ／グリセロールデヒドラターゼの触媒量によって異なり、 $X/Y^2$ が10〜8,000の範囲にないような量を供給できるような濃度であれば特に制限されないが、好ましくは0.1〜50(w/v)%,より好ましくは0.2〜40(w/v)%である。また、上記方法において、グリセリンを溶解するのに使用される液体は、グリセリンが溶解するものであれば特に制限されないが、例えば、水、生理食塩水、リン酸カリウムバッファー、クエン酸カリウムバッファー、リン酸緩衝液、グッドの緩衝液、トリス緩衝液等の、各種緩衝液などが挙げられる。これらのうち、水、リン酸カリウムバッファー、リン酸緩衝液が好ましく使用される。本発明では、酵素活性のために、反応系中にカリウムイオンが存在することが好ましい。反応系中にカリウムイオンを存在させるために、反応媒体として、リン酸カリウムバッファー、クエン酸カリウムバッファー、その他のカリウム塩水溶液等のカリウム塩を含む緩衝液を使用することが特に好ましい。カリウムイオンの濃度は、特に制限されないが、好ましくは5mM〜1M、より好ましくは10〜500mMである。

[0048] 本発明の方法によると、このようにして得られた3-HPAは、菌体および／または菌体処理物が除去された後、水素添加されて、所望の1,3-プロパンジオールを形成する。したがって、本発明の第二は、本発明の方法によって製造された3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドから菌体および／または菌体処理物を除去した後、該3-ヒドロ

キシプロピオンアルデヒドを水素添加して、1, 3-プロパンジオールを製造する段階を有する、1, 3-プロパンジオールの製造方法に関するものである。本発明の方法によると、グリセリンから3-HPAへの変換反応のみが優先的に高い転化率で起こるため、製造される3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドは、基質であるグリセリンはもとより、他の副生成物をもほとんど含まずに高純度で製造できる。このため、本発明の3-HPAを用いると、菌体／菌体処理物を分離・除去するという簡単な操作によって、高純度の3-HPAが得られ、これを水素添加することによって、1, 3-プロパンジオールもまた高純度で製造することができる。

[0049] 本発明において、菌体／菌体処理物の分離・除去は、公知の方法によって行なわれ、特に制限されるものではないが、具体的には、濾過、限外濾過、沈降などの公知の方法を用いることによって、3-HPAから固定化菌体を容易に分離できる。

[0050] 本発明において、水素添加は、発酵によってもあるいは化学合成法によってもいづれでもよいが、化学合成法が好ましい。これは、化学合成法を用いて3-HPAから1, 3-プロパンジオールを製造することによって、所望の1, 3-プロパンジオールの純度及び収率が向上できるという利点があるからである。この際、化学合成法は、公知の水素添加法が使用でき、またその反応形態も気相または液相のいずれで行なわれてもよいが、好ましくは、3-HPAを、液相、より好ましくは、水溶液中で水素添加されて、所望の1, 3-プロパンジオールを形成することが好ましい。3-HPAから1, 3-プロパンジオールを製造するための化学合成法は、特に制限されるものではなく、公知の方法が使用される。例えば、パラジウムカーボンを加え、気相部を水素で置換し、攪拌しながら水素で水素化する方法；30～180℃の温度、5～300バール水素圧力で、pH値2.5～7.0の水溶液中で、酸化物担体上にルテニウムが担持された不均一触媒存在下で3-HPAを水素化する方法（例えば、特表2002-516614号公報）；酸化チタン上に白金が担持された担体触媒上で、水溶液中の5～100重量％濃度の3-HPAを、pH値2.5～6.5で、温度30～180℃及び水素圧5～300バールで、水素添加する方法（例えば、特開平5-213800号公報）；3-HPAを、水溶液中で、PtがTiO<sub>2</sub>に担持した触媒やNi／Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>／SiO<sub>2</sub>触媒等の触媒の存在下に、水素圧5～300バール、pH値2.5～6.5及び温度30～180℃で、接触水素添加する方

法(例えば、特開平6-40973号公報)などが挙げられる。

- [0051] 本発明の方法によると、1, 3-プロパンジオール及び水が主に生成し、そのほかの副生成物や二次生成物はほとんど存在しない。このため、精製が主に水の除去のみであり、複雑でなく、その後1, 3-プロパンジオールを原料として用いて繊維を製造した際にも繊維等の製品に変色や重合不良をもたらす恐れがない。この際使用できる1, 3-プロパンジオールの精製方法としては、特に制限されず、公知の精製方法が使用できるが、例えば、蒸留、逆浸透膜等の方法が使用できる。
- [0052] 本発明によると、上記と同様にして得られた3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを酸化することによって、3-ヒドロキシプロピオン酸が製造される。したがって、本発明の第三は、本発明の方法によって製造された3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを酸化して、3-ヒドロキシプロピオン酸を製造する段階を有する、3-ヒドロキシプロピオン酸の製造方法に関するものである。
- [0053] 本発明において、3-ヒドロキシプロピオン酸の純度を考慮して、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドの酸化前に、予め菌体／菌体処理物の分離・除去することが好ましい。この際、菌体／菌体処理物の分離・除去は、公知の方法によって行なわれ、特に制限されるものではないが、具体的には、濾過、限外濾過、沈降などの公知の方法を用いることによって、3-HPAから固定化菌体を容易に分離できる。
- [0054] 本発明において、3-HPAから3-ヒドロキシプロピオン酸の製造は、発酵によってもあるいは化学合成法によってもいずれでもよいが、製造される3-ヒドロキシプロピオン酸の純度や収率を考慮すると、化学合成法が好ましい。本発明による酸化は、公知の酸化法が使用でき、またその反応形態も気相または液相のいずれで行なわれてもよいが、液相で、より好ましくは、水溶液中で、3-HPAを酸化することが好ましい。この際使用される方法は、特に制限されるものではなく、プラチナカーボン、パラジウムカーボン等を使用した方法などの、公知の方法が使用できる。具体的には、パラジウムカーボンを加え、気相部を酸素で置換し、攪拌しながら酸素で酸化する方法; 3-HPA反応液に触媒として、プラチナカーボンと炭酸水素ナトリウムを入れ、酸素と接触させて反応させる方法などが挙げられる。
- [0055] 本発明の方法によると、3-ヒドロキシプロピオン酸が主に生成する。このため、精製

が容易である。この際、精製は必ずしも必要ではないが、使用する際の3-ヒドロキシプロピオン酸の精製方法としては、特に制限されず、公知の精製方法が使用できるが、例えば、蒸留、逆浸透膜等の方法が使用できる。

[0056] また、本発明によると、上記と同様にして得られた3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを酸性条件下で反応することによって、アクロレインが製造される。したがって、本発明の第四は、本発明の方法によって製造される3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを酸性条件下で反応して、アクロレインを製造する段階を有する、アクロレインの製造方法に関するものである。また、本発明によると、本発明の第四の態様で得られたアクロレインを酸化することによって、アクリル酸が製造される。したがって、本発明の第五は、上記方法によって製造されるアクロレインを酸化してアクリル酸を製造する段階を有する、アクリル酸の製造方法に関するものである。

[0057] 本発明の第四及び第五において、最終生成物であるアクロレイン及びアクリル酸の純度を考慮して、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドの酸化前に、予め菌体／菌体処理物の分離・除去することが好ましい。この際、菌体／菌体処理物の分離・除去は、公知の方法によって行なわれ、特に制限されるものではないが、具体的には、濾過、限外濾過、沈降などの公知の方法を用いることによって、3-HPAから固定化菌体を容易に分離できる。

[0058] 本発明において、3-HPAからアクロレインの製造は、3-HPAを酸性条件下で反応させることによって、容易に達成される。例えば、3-HPAを含む溶液に、pHが1〜5、好ましくは1.5〜4.5となるように、塩酸、硫酸、硝酸等の酸、好ましくは塩酸を、添加・混合した後、5〜90℃、好ましくは7〜85℃で、1〜360分間、好ましくは2〜120分間、静置することによって、アクロレインが効率よく製造できる。この工程では、酸以外の成分は使用しないため、副生成物がほとんど存在せず、また、上記反応は高い転化率及び選択率を有するため、アクロレインは、高純度でかつ高収率で製造できる。

[0059] 本発明において、このようにして形成したアクロレインは、酸化されて、アクリル酸となる。この際、アクロレインからアクリル酸の製造方法は、特に制限されるものではなく、発酵によってもあるいは化学合成法によってもいずれでもよいが、製造されるアクリ

ル酸の純度や収率を考慮すると、化学合成法が好ましい。本発明による酸化は、公知の酸化法が使用でき、またその反応形態も気相または液相のいずれで行なわれてもよい。液相におけるアクロレインの酸化方法としては、公知の方法が使用でき、特に制限されないが、例えば、アクロレインを含む反応液に酸素を加えながらパラジウムカーボン触媒の存在下で、アクロレインを酸化することによってアクリル酸を製造する方法などが使用できる。また、気相におけるアクロレインの酸化方法としては、公知の方法が使用でき、特に制限されないが、例えば、特開昭64-63543号公報、特開昭63-146841号公報などの、公知の方法が使用できる。具体的には、アクロレインを酸化してアクリル酸とするのに使用される触媒は、特に制限されるものではなく、公知の触媒が単独であるいは組み合わせて使用される。例えば、モリブデンおよびバナジウムを含むものが使用でき、好ましくは一般式  $\text{Mo}_a - \text{V}_b - \text{W}_c - \text{Cu}_d - \text{A}_e - \text{B}_f - \text{C}_g - \text{O}_x$  (Moはモリブデン、Vはバナジウム、Wはタングステン、Cuは銅、Aはアンチモン、ビスマス、スズ、ニオブ、コバルト、鉄、ニッケルおよびクロムから選ばれる少なくとも一種の元素を表し、Bはアルカリ金属およびアルカリ土類金属から選ばれる少なくとも1種の元素を表し、Cはケイ素、アルミニウム、ジルコニウムおよびチタニウムから選ばれた少なくとも1種の元素を表し、Oは酸素を表し、a、b、c、d、e、f、gおよびxは、それぞれMo、V、W、Cu、A、B、CおよびOの原子比を表し、a=12としたとき、b=2-14、c=0-12、d=0.1-5、e=0-5、f=0-5、g=0-20であり、xは各元素の酸化状態により定まる値である)で示されるものが例示できる。また、この際使用される触媒の調製方法および混合成形方法もまた、特に限定されるものではなく、一般に用いられている方法および原料を採用することができる。また、触媒の形状についても特に限定されず、球状、円柱状、円筒状などとしことができ、成形方法も担持成形、押し出し成形、打錠成形などを用いることができ、更に耐火用担体にこれらの触媒物質を担持させた形態のものも有用である。

[0060] また、アクロレインからアクリル酸への反応条件もまた特に制限されないが、例えば、アクロレインを、アクリル酸に転化するのに要する酸素及びスチームと混合し、このアクロレイン含有ガスを、反応圧力が常圧から0.5MPaの範囲、空間速度300-5,000hr<sup>-1</sup>(STP)の範囲で供給し、反応温度は200-400℃、好ましくは220-380

℃に制御して行なう。

[0061] このようにして得られたアクリル酸は、常法によって回収される。例えば、アクリル酸生成ガスを熱交換器で冷却した後、重合禁止剤を含む捕集溶剤と向流接触させて、アクリル酸水溶液を得、これを抽出、蒸留、共沸蒸留等の方法によって、アクリル酸として単離される。

[0062] また、本発明において、上記第四の態様で得られたアクロレインは、次に触媒の存在下で酸化的エステル化されて、アクリル酸エステルとなる。したがって、本発明の第六は、本発明の方法によって製造されるアクロレインを酸化的エステル化してアクリル酸エステルを製造する段階を有する、アクリル酸エステルの製造方法に関するものである。この際、アクロレインからアクリル酸エステルの製造方法は、特に制限されるものではなく、発酵によってもあるいは化学合成法によってもいずれでもよいが、製造されるアクリル酸エステルの純度や収率を考慮すると、化学合成法が好ましい。本発明による酸化は、公知の酸化法が使用でき、またその反応形態も気相または液相のいずれで行なわれてもよいが、触媒の存在下で液相で行なわれることが特に好ましい。この際、触媒は、上記アクリル酸の製造において使用されたのと同様の触媒が使用できる。また、アクロレインからアクリル酸エステルへの反応条件もまた特に制限されないが、例えば、上記アクリル酸の製造において使用されたのと同様の条件が使用できる。このようにして得られたアクリル酸エステルは、常法によって回収される。

## 実施例

[0063] 以下、本発明の実施例により具体的に説明する。

### [0064] 実施例1

E.coli JM109を宿主として、pBR322由来の複製開始点(ori)を持つプラスミドに *Klebsiella pneumoniae* ATCC25955のジオールデヒドラターゼをコードする遺伝子を組み込んだベクター1(図1A、配列番号:1)と、p15A由来の複製開始点(ori)を持つプラスミドに *Klebsiella pneumoniae* ATCC25955のジオールデヒドラターゼ再活性化因子をコードする遺伝子を組み込んだベクター2(図1B、配列番号:2)を導入した菌株JM109/ベクター1(DD)/ベクター2(DDR)を、アンピリシン50  $\mu$ g/ml、クロラムフェニコール100  $\mu$ g/mlを含むLB培地に接種し、37℃で15時間培養した。この

培養液を、アンピリシン50  $\mu$ g/ml、クロラムフェニコール100  $\mu$ g/mlを含むLB培地 200mlに接種し、37°Cで振盪培養した。培養開始後、OD660=0.8になった時、1mMの濃度となるようにIPTGを培養液に加え、さらに5時間培養した後、培養を停止した。菌体は、遠心分離機にて回収した。回収した菌体をpH8の50mMリン酸カリウムバッファーで2度洗浄し、OD660=0.2となるように、pH8の50mMリン酸カリウムバッファーに懸濁し、この菌体懸濁液を粗酵素液とした。なお、配列番号:1及び2は、それぞれ、本実施例で使用されるベクター1及び2の塩基配列を示すものである。

- [0065] この粗酵素液4mlに、pH8の50mMリン酸カリウムバッファー3ml、2Mグリセリン1ml、0.5M KCl 1ml、150  $\mu$ M補酵素B12 1mlを加えて、37°Cで60分間反応を行なった。反応液の一部をとり、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドの定量を行なった。反応液に対して1倍量の0.1Mクエン酸カリウムバッファー(pH3.0)を添加して、反応を停止した。これに、1倍量の水を加え、0.5倍量の0.1%3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン塩酸塩一水和物水溶液を添加し、305nmの吸光度を測定し、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドの濃度を決定した。この結果、反応液中には0.1Mの3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドが生成した。残りの反応液を濾過して菌体を除去し、濾液を蓋つきの試験管に入れた後、5%パラジウムカーボン0.015gを加え、気相部を水素で置換し、常圧で500mlの水素を風船に入れて、気相部に接続して密閉し、攪拌しながら5時間、60°Cの湯浴中で反応を行なった。反応液を分析した結果、1,3-プロパンジオールが0.098Mの濃度で確認された。この際、菌体の触媒量[X(U/gグリセリン)]、グリセリン濃度[Y(g/100ml)、及びX/Y<sup>2</sup>の値を、下記表1に要約する。なお、下記表1において、背景技術の項で、関連文献として列挙したものについての、触媒量[X(U/gグリセリン)]、グリセリン濃度[Y(g/100ml)、及びX/Y<sup>2</sup>の値をも合わせて、下記表1に要約する。

[0066] 実施例2

E.coli JM109を宿主として、pBR322由来の複製開始点(ori)を持つプラスミドに *Klebsiella pneumoniae* ATCC25955のグリセロールデヒドラターゼをコードする遺伝子を組み込んだベクター1'(第2A図、配列番号:3)と、p15A由来の複製開始点(ori)

を持つプラスミドに *Klebsiella pneumoniae* ATCC25955 のグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子をコードする遺伝子を組み込んだベクター2' (第2B図、配列番号:4) 菌株JM109/ベクター1' (GD)/ベクター2' (GDR) を、アンピリシン  $50 \mu\text{g/ml}$ 、クロラムフェニコール  $100 \mu\text{g/ml}$  を含むLB培地に接種し、 $37^\circ\text{C}$  で15時間培養した。この培養液を、アンピリシン  $50 \mu\text{g/ml}$ 、クロラムフェニコール  $100 \mu\text{g/ml}$  を含むLB培地 200ml に接種し、 $37^\circ\text{C}$  で振盪培養した。培養開始後、 $\text{OD}_{660} = 0.8$  になった時、1mM の濃度となるようにIPTGを培養液に加え、さらに5時間培養した後、培養を停止した。菌体は、遠心分離機にて回収した。回収した菌体をpH8の50mMリン酸カリウムバッファーで2度洗浄し、 $\text{OD}_{660} = 0.2$  となるように、pH8の50mMリン酸カリウムバッファーに懸濁した。この懸濁液に、最終濃度が1%となるようにトルエンを加え、ボルテックスミキサーで5分間攪拌した後、遠心分離にて菌体を回収した。菌体を、 $\text{OD}_{660} = 0.2$  となるように、pH8の50mMリン酸カリウムバッファーに懸濁した。この懸濁液を、トルエン処理菌体液とした。なお、配列番号:3及び4は、それぞれ、本実施例で使用されるベクター1' 及び2' の塩基配列を示すものである。

- [0067] このトルエン処理菌体液4mlに、pH8の50mMリン酸カリウムバッファー3ml、2Mグリセリン1ml、0.5M KCl 1ml、 $150 \mu\text{M}$  補酵素B12 1mlを加えて、 $37^\circ\text{C}$  で20分間反応を行なった。反応液の一部をとり、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドの定量を行なった。反応液に対して1倍量の0.1Mクエン酸カリウムバッファー (pH3.0) を添加して、反応を停止した。これに、1倍量の水を加え、0.5倍量の0.1%3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン塩酸塩一水和物水溶液を添加し、305nmの吸光度を測定し、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドの濃度を決定した。この結果、反応液中に0.196Mの3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドが生成したことを確認した。また、グリセリンから3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドへの転化率は、98%であった。残りの反応液を濾過してトルエン処理菌体を除去し、濾液を蓋つきの試験管に入れた後、5%パラジウムカーボン0.015gを加え、気相部を水素で置換し、常圧で500mlの水素を風船に入れて、気相部に接続して密閉し、攪拌しながら5時間、 $60^\circ\text{C}$  の湯浴中で反応を行なった。反応液を分析した結果、1,3-プロパンジオールが0.196Mの濃度で確認された。この際、トルエン処理菌体の触媒量[X(U/gグリセリン)]、グ



リセリン濃度[Y(g/100ml)、及びX/Y<sup>2</sup>の値を、下記表1に要約する。

[0068] 実施例3

実施例2と同様にして、0.196Mの3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド(対グリセリン転化率98%)を製造し、これを含む反応液を、35%塩酸でpH2に調整し、1時間、常温にて静置した。得られた反応液中のアクロレインを定量したところ、0.130Mのアクロレインが生成したことを確認した。

[0069] 実施例4

実施例1と同様にして、0.188Mの3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド(対グリセリン転化率94%)を製造し、これを含む反応液を蓋付き試験管に入れた後、5%パラジウムカーボン0.015gを添加し、気相部を酸素に置換し、常圧で1リットルの酸素を風船に入れて、気相部に接続して密栓し、攪拌しながら、5時間、60℃で反応を行なった。この反応液を分析した結果、0.150Mの3-ヒドロキシプロピオン酸が生成したことを確認した。

[0070] 実施例5

実施例2と同様にして、0.196Mの3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド(対グリセリン転化率98%)を製造し、これを含む反応液10mlを、35%塩酸でpH2に調整し、1時間、常温にて静置した。得られた反応液中のアクロレインを定量したところ、0.150Mのアクロレインが生成したことを確認した。

[0071] 次に、このようにして得られたアクロレインに、メタノールを加え、酸化触媒として5%パラジウムカーボン0.015gを用いて、良く攪拌しながら、酸素雰囲気下で反応を行なったところ、0.188Mのアクリル酸メチルが生成した。

[0072] 実施例6

実施例2と同様にして、0.196Mの3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド(対グリセリン転化率98%)を製造し、これを含む反応液を、35%塩酸でpH2に調整し、1時間、常温にて静置した。得られた反応液中のアクロレインを定量したところ、0.148Mのアクロレイン(対3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド転化率96.9%)が生成したことを確認した。

[0073] 次に、このようにして得られたアクロレインを含む反応液を、蓋付き試験管に入れた

後、5%パラジウムカーボン0.015gを添加し、気相部を酸素に置換し、常圧で1リットルの酸素を風船に入れて、気相部に接続して密栓し、攪拌しながら、5時間、60℃で反応を行なった。この反応液を分析した結果、0.120Mのアクリル酸が生成したことを確認した。

[0074] 実施例7

*Klebsiella pneumoniae* ATCC25955を、グリセリンを炭素源にして嫌気培養し、対数増殖期まで増殖させた。この時点の菌体培養液を、実施例2で記載されるのと同様にして、1%トルエン処理した後、集菌した。このようにして集められた*Klebsiella pneumoniae* ATCC25955 湿重量20g(酵素活性 4000U)の菌体を、135  $\mu$  M 補酵素B12、0.2Mグリセリンを含む50mMリン酸カリウムバッファー(pH8)1リットルに加え、37℃で120分間反応した。この反応液を濾過してトルエン処理菌体を除去した後、その一部をとり、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドの定量を行なったところ、0.196Mの3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドの生成が確認された。このようにして得られた3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを、1リットルのセパラブルフラスコに入れ、5%パラジウムカーボン1.5gを加え、気相部を酸素で置換し、気相部にわずかの酸素を流通させて外気の侵入を防ぎ、かつ攪拌しながら、60℃で5時間、反応を行なった。反応液を分析した結果、0.178Mの3-ヒドロキシプロピオン酸を検出した。この際、トルエン処理菌体の触媒量[X(U/gグリセリン)]、グリセリン濃度[Y(g/100ml)、及びX/Y<sup>2</sup>の値を、下記表1に要約する。

[0075] 実施例8

*Klebsiella pneumoniae* ATCC25955を、グリセリンを炭素源にして嫌気培養し、対数増殖期まで増殖させた。この時点の菌体培養液を、実施例2で記載されるのと同様にして、1%トルエン処理した後、集菌した。このようにして集められた*Klebsiella pneumoniae* ATCC25955 湿重量20g(酵素活性 4000U)の菌体を、135  $\mu$  M 補酵素B12、0.2Mグリセリンを含む50mMリン酸カリウムバッファー(pH8)1リットルに加え、37℃で60分間反応した。この反応液を濾過してトルエン処理菌体を除去した後、その一部をとり、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドの定量を行なったところ、0.197Mの3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドの生成が確認された。このようにして得られ

た3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを含む反応液を、35%塩酸でpH2に調整し、常温で1時間、静置した。得られた反応液中のアクロレインを定量したところ、0.130Mのアクロレインが生成したことを確認した。この際、トルエン処理菌体の触媒量[X(U/gグリセリン)]、グリセリン濃度[Y(g/100ml)、及びX/Y<sup>2</sup>の値を、下記表1に要約する。

[0076] [表1]

表 1

出典	触媒量 X(U/gGly)	基質濃度 Y(%)	X/Y <sup>2</sup>	転化率 (%)
J. Bac vol. 181, No. 13 '99 p4110-4113	8	0.92	8.989	1.4
The J. of Biolog Chem vol. 272, No. 51, '97	1	1.84	0.273	0.17
Arch Microbiol 174 81-88 (2000)	8	0.92	8.989	1.4
The J. of Biolog Chem vol. 274, No. 6, '99	1	11.04	0.010	0.27
The J. of Biolog Chem vol. 274, No. 6, '99	7	13.8	0.034	0.75
実施例1	91	1.84	27	50
実施例2	533	1.84	157	98
実施例3	533	1.84	157	98
実施例7	217	1.84	64	98
実施例8	217	1.84	64	98.5

[0077] 実施例9

基質濃度4.6%(0.5M)のグリセリン、135 $\mu$ Mの補酵素B12を含む50mM リン酸カリウムバッファー(pH8)溶液10mlに、酵素活性200U/g湿重量のトルエン処理(*Klebsiella pneumoniae*)菌体を、下記表2に示される触媒量になるように添加し、この混合液を攪拌しながら、暗所にて37℃で6時間、反応させた。所定時間反応させた後の反応混合物を遠心分離することによって、トルエン処理菌体を除去し、上清を用いて、グリセリンから3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドの転化率を測定した。この際、トルエン処理菌体の触媒量[X(U/gグリセリン)]、グリセリン濃度[Y(g/100ml)、及びX/Y<sup>2</sup>の値を、下記表2に要約する。

[0078] [表2]

表 2

菌体量 (g)	触媒量 X (U/g グリセリン)	基質濃度 (Y) (%)	$X/Y^2$	転化率 (%)
0.1	920	4.6	43	52
0.2	1840	4.6	87	89
0.3	1304	4.6	95	96
0.5	2174	4.6	103	98
1	4348	4.6	205	98
2	8696	4.6	411	98
5	21739	4.6	1027	97
10	43478	4.6	2055	98
15	65217	4.6	3082	95
20	86957	4.6	4109	95
25	108696	4.6	5137	90
30	130435	4.6	6164	85
35	152174	4.6	7192	70
40	173913	4.6	8219	65
45	195652	4.6	9246	51
50	217391	4.6	10274	30

[0079] 上記表2の結果から、 $X/Y^2$ が80を超えると、約90%以上という高い転化率が達成できるが、8219以下であると転化率はやはり70%を下回ることが示される。また、 $X/Y^2$ が87～6164であると、80%以上の転化率が達成され、特に $X/Y^2$ が95～5137であると、90%以上という非常に転化率が達成できることが示される。

#### [0080] 実施例10

実施例2に記載されたのと同様にして、菌株JM109／ベクター1' (GD)のトルエン処理菌体液を調製した。このトルエン処理菌体(酵素活性9,900U/g湿重量)を、基質濃度9.2%の(1M)のグリセリン、135 $\mu$ Mの補酵素B12を含む50mM リン酸カリウムバッファー(pH8)溶液中に、下記表3に示される触媒量になるように添加し、全量が10mlとなるように調整し、37℃暗所にて、2時間反応させた。所定時間反応させた後の反応混合物を遠心分離することによって、トルエン処理菌体を除去し、上清を用いて、グリセリンから3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドの転化率を測定した。この際、トルエン処理菌体の触媒量[X(U/gグリセリン)]、グリセリン濃度[Y(g/100ml)]、及び $X/Y^2$ の値を、下記表3に要約する。

[0081] [表3]

表 3

菌体量 (g)	触媒量 X (U/g グリセリン)	基質濃度 (Y) (%)	$X/Y^2$	転化率 (%)
0.051	543	9.2	6	43.8
0.101	1087	9.2	13	72.1
0.202	2174	9.2	26	79.3
0.303	3261	9.2	39	79.4
0.404	4348	9.2	51	83.3
0.752	8096	9.2	77	78.3

[0082] 上記表3の結果から、 $X/Y^2$ が10を超えると、70%以上という高い転化率が達成でき、特に $X/Y^2$ が50を超えると、80%を超えるより高い転化率が達成できることが示される。なお、本実施例では、9.2%というかなり高い基質濃度を用いても、 $X/Y^2$ が10以上の条件でトルエン菌体処理物をグリセリンに作用させることによって、70%を超す転化率が達成できることが示される。また、本実施例で示されるように、本発明の方法によると、高い基質濃度下でも高い転化率が達成できるため、本発明の方法は、工業的レベル上、非常に好ましいことが示唆される。

#### 産業上の利用可能性

[0083] 本発明の3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドの製造方法によると、3-HPAを、特定の範囲内になるように酵素量を制御して、ジオール/グリセロールデヒドラターゼ及びジオール/グリセロールデヒドラターゼを作用させると、グリセリン→3-HPA以外の副反応は誘導せずに、グリセリン→3-HPAが選択的に起こり、80%以上、場合によっては90%以上という高い転化率が達成でき、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドは高い収率で製造できる。また、本発明の方法では、発酵法によらずにグリセリン→3-HPAの反応が可能であるため、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドは、副生成物をほとんど含まずに高純度で製造できる。ゆえに、本発明の方法によって得られた3-HPAは、菌体/菌体処理物の濾別、限外濾過、沈降などの非常に簡単な精製工程によって、水素添加による1,3-プロパンジオールの製造の中間体として使用できる。上記利点に加えて、反応終了後には、1,3-プロパンジオール及び水が主に残るのみであるため、精製に有機溶剤を使用する必要がないため、有機溶剤の回収や後処理が不用であり、また、環境の面でも好ましい。

[0084] また、本発明は、上記したようなほとんど副生成物を含まない3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを酸性条件下で反応させてアクロレインを得、さらにアクロレインを酸化してアクリル酸を製造する方法；および上記したようなほとんど副生成物を含まない3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを酸性条件下で反応させてアクロレインを得、さらにアクロレインを酸化的エステル化してアクリル酸エステルを製造する方法に関するものである。当該方法によると、原料たる3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドは副生成物が少ないため、これを用いて製造されるアクロレイン、さらにこれから製造されるアクリル酸やアクリル酸エステルもまた、高純度を有する。

[0085] 本発明によると、3-HPAが高い転化率及び変換率でかつほとんど副生成物を含まずに製造できるので、これから1, 3-プロパンジオール、3-ヒドロキシプロピオン酸、アクロレイン、アクリル酸及びアクリル酸エステルが高い収率及び純度で製造することができ、このため、このようにして製造された1, 3-プロパンジオールは、ポリエステル及びポリウレタンの製造に使用されるモノマーとしてならび環状化合物の合成用出発材料として利用でき、1, 3-プロパンジオールには副生成物がほとんど存在しないので、これを用いて製造された繊維は変色を起こさない。また、このようにして製造されたアクリル酸／アクリル酸エステルは、アクリル繊維共重合体用、あるいはエマルジョンとして粘接着剤に用いられる他、塗料、繊維加工、皮革、建築用材等として利用できる。

#### 図面の簡単な説明

[0086] [図1A]実施例1において使用される発現プラスミドであるベクター1の遺伝子マップを示すものである。図において、 $Amp^r$ は、アンピシリン耐性遺伝子を； $Cm^r$ は、クロラムフェニコール耐性遺伝子を； $lacI_q$ は、ラクトースレプレッサー遺伝子を； $P_{tac}$ は、tacプロモーターを、それぞれ、示す。

[図1B]実施例1において使用される発現プラスミドであるベクター2の遺伝子マップを示すものである。図において、 $Amp^r$ は、アンピシリン耐性遺伝子を； $Cm^r$ は、クロラムフェニコール耐性遺伝子を； $lacI_q$ は、ラクトースレプレッサー遺伝子を； $P_{tac}$ は、tacプロモーターを、それぞれ、示す。

[図2A]実施例2において使用される発現プラスミドであるベクター1'の遺伝子マップ

を示すものである。図において、Amp<sup>r</sup>は、アンピシリン耐性遺伝子を；Cm<sup>r</sup>は、クロラムフェニコール耐性遺伝子を；lacI<sub>q</sub>は、ラクトースレプレッサー遺伝子を；P<sub>tac</sub>は、tacプロモーターを、それぞれ、示す。

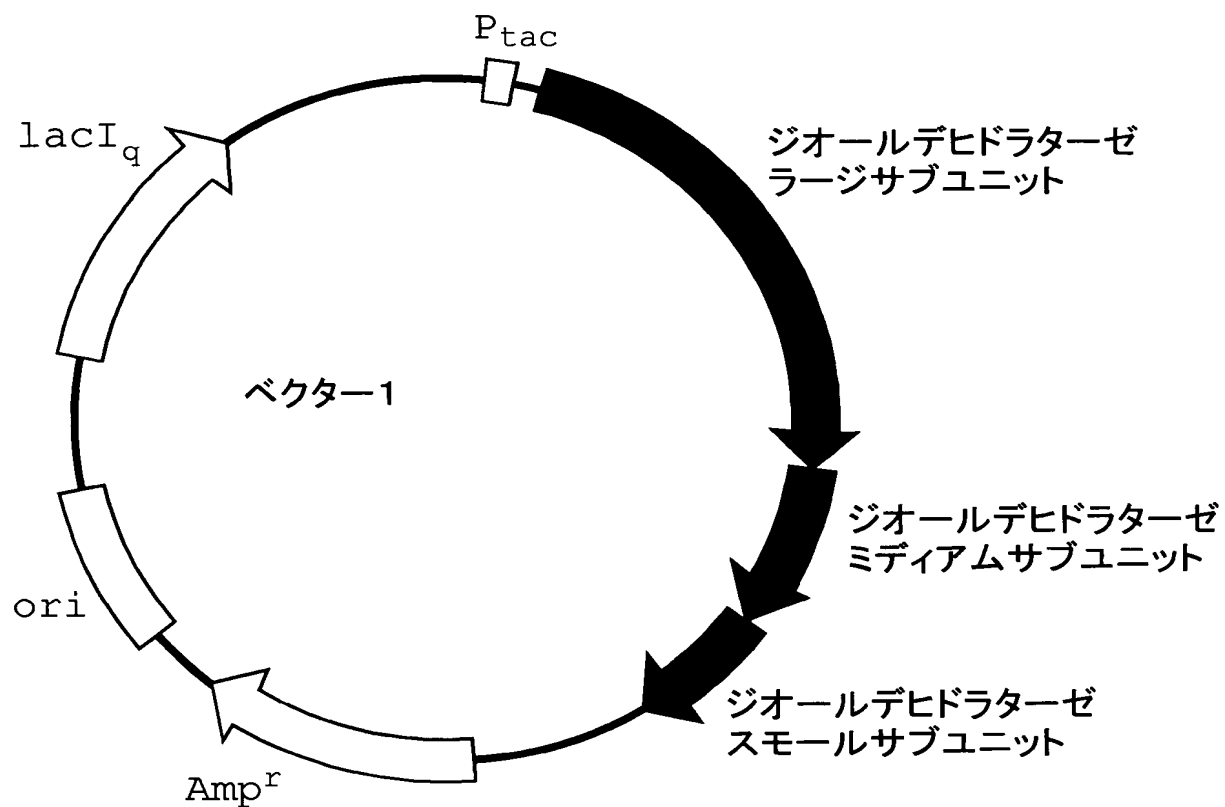
[図2B]実施例2において使用される発現プラスミドであるベクター2'の遺伝子マップを示すものである。図において、Amp<sup>r</sup>は、アンピシリン耐性遺伝子を；Cm<sup>r</sup>は、クロラムフェニコール耐性遺伝子を；lacI<sub>q</sub>は、ラクトースレプレッサー遺伝子を；P<sub>tac</sub>は、tacプロモーターを、それぞれ、示す。

## 請求の範囲

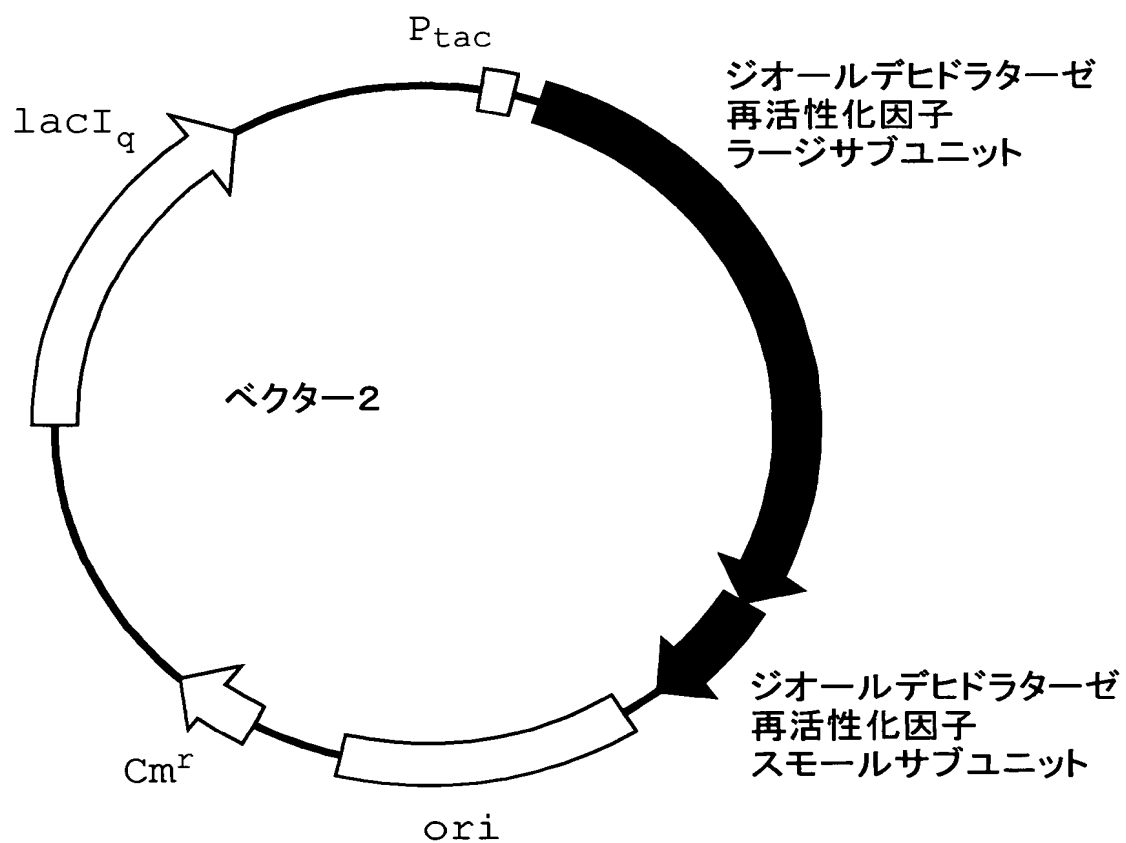
- [1] ジオールデヒドラターゼおよび／またはグリセロールデヒドラターゼの触媒量 $[X(\text{U} / \text{g} \text{グリセリン})]$ をグリセリン濃度 $[Y(\text{g} / 100\text{ml})]$ の二乗で割った値 $(X / Y^2)$ が10～8,000である条件下で、ジオールデヒドラターゼおよび／またはグリセロールデヒドラターゼならびに必要であればジオールデヒドラターゼ再活性化因子および／またはグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子を含んでなる菌体および／または菌体処理物を用いて、グリセリンを脱水して3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを製造する段階を有する3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドの製造方法。
- [2] グリセリンの脱水反応は菌体を用いて好気性条件下で行なわれる、請求項1に記載の方法。
- [3] グリセリンの脱水反応は菌体処理物を用いて行なわれる、請求項1に記載の方法。
- [4] 請求項1～3のいずれかに記載の方法によって製造される3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドから菌体および／または菌体処理物を除去した後、該3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを水素添加して、1, 3-プロパンジオールを製造する段階を有する、1, 3-プロパンジオールの製造方法。
- [5] 請求項1～3のいずれかに記載の方法によって製造される3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを酸化して、3-ヒドロキシプロピオン酸を製造する段階を有する、3-ヒドロキシプロピオン酸の製造方法。
- [6] 請求項1～3のいずれかに記載の方法によって製造される3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを酸性条件下で反応して、アクロレインを製造する段階を有する、アクロレインの製造方法。
- [7] 請求項6に記載の方法によって製造されるアクロレインを酸化してアクリル酸を製造する段階を有する、アクリル酸の製造方法。
- [8] 請求項6に記載の方法によって製造されるアクロレインを酸化的エステル化してアクリル酸エステルを製造する段階を有する、アクリル酸エステルの製造方法。



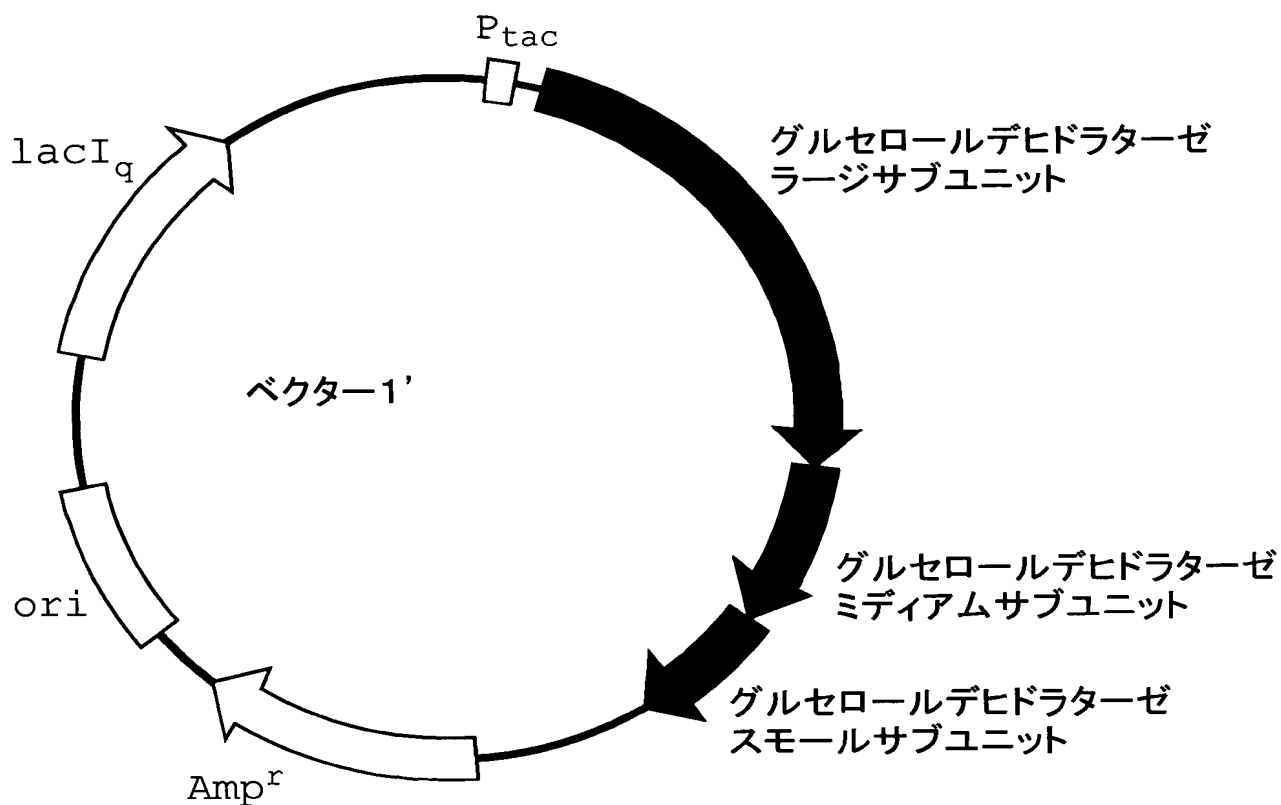
[図1A]



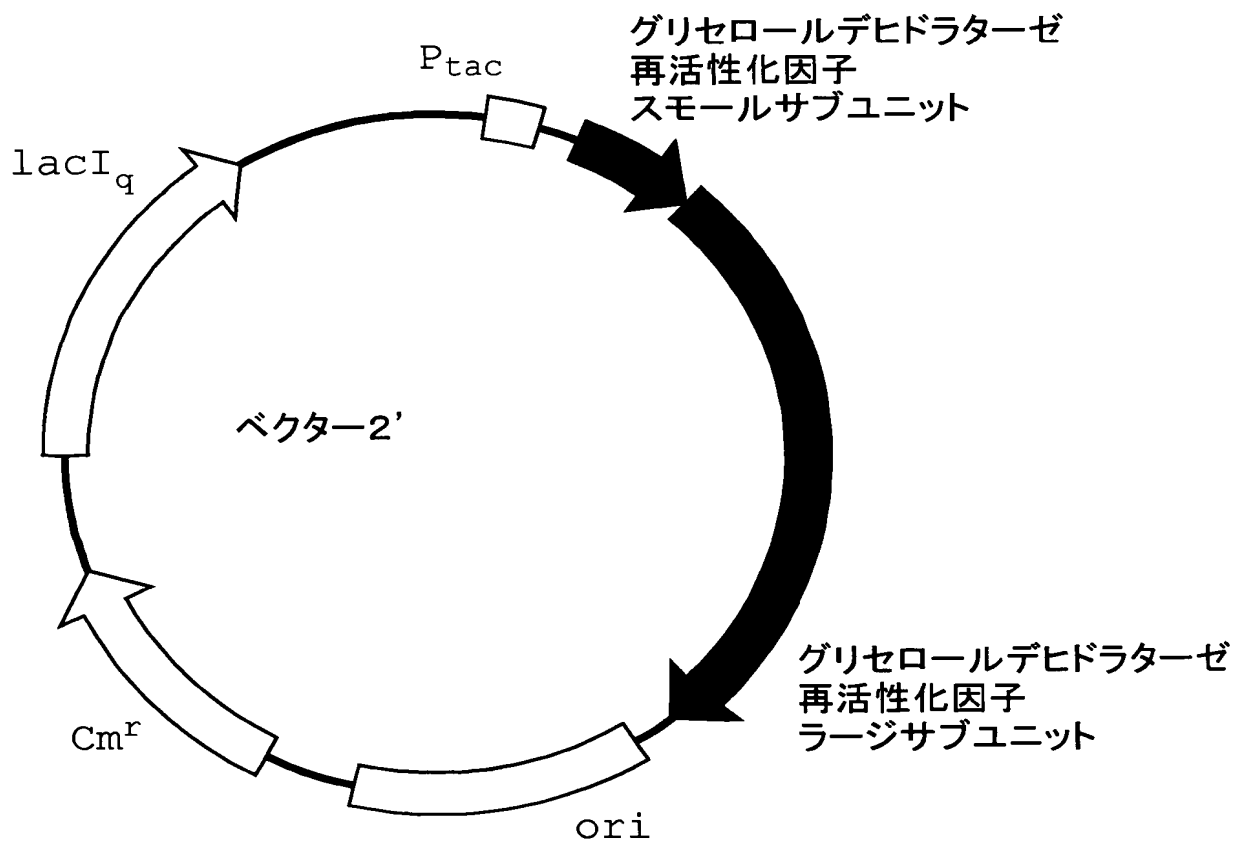
[図1B]



[図2A]



[図2B]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014213

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12P7/24, C07C29/141, C07C31/20, C07C45/65, C07C47/22,  
C07C51/235, C07C59/01, C07C67/39, C07C69/653, C12P7/18,  
C12P7/40, C12P7/42, C12P7/62, C07B61/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12P7/24, C07C29/141, C07C31/20, C07C45/65, C07C47/22,  
C07C51/235, C07C59/01, C07C67/39, C07C69/653, C12P7/18,  
C12P7/40, C12P7/42, C12P7/62, C07B61/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Vancauwenberge, J.E. et al., "Bacterial conversion of glycerol to beta-hydroxy propionaldehyde", Appl.Environ.Microbiol., (1990), Vol.56, No.2, pages 329 to 332, particularly, Fig. 4	1-3 4-8
X Y	Slininger, P.J. et al., "Optimizing aerobic conversion of glycerol to 3-hydroxypropional dehyde", Appl.Environ.Microbiol., (1985), Vol.50, No.6, pages 1444 to 1450, particularly, Fig. 3, Table 2	1-3 4-8
Y	Slininger, P.J. et al., "Production of 3-Hydroxypropionaldehyde from Glycerol", Appl. Environ.Microbiol., (1983), Vol.46, No.1, pages 62 to 67, particularly, Figs. 1, 2	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
25 November, 2004 (25.11.04)

Date of mailing of the international search report  
14 December, 2004 (14.12.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014213

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 5-213800 A (Degussa AG.), 24 August, 1993 (24.08.93), & CA 2079655 A & EP 535565 A1 & DE 4132663 A & AU 2609692 A & BR 9203789 A & US 5364984 A	4
Y	JP 2000-154164 A (Mitsui Chemicals, Inc.), 06 June, 2000 (06.06.00), (Family: none)	8
Y	Skraly, F.A. et al., "Construction and Characterization of a 1,3-Propanediol Operon", Appl.Environ.Microbiol., (1998), Vol.64, No.1, pages 98 to 105	1-8
Y	TOBIMATSU, T. et al., "Identification and Expression of the Genes Encoding a Reactivat ing Factor for Adenosylcobalamin-Dependent Glycerol Dehydratase", J.Bacteriol., (1999), Vol.181, pages 4110 to 4113	1-8

BEST AVAILABLE COPY

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12P7/24, C07C29/141, C07C31/20, C07C45/65, C07C47/22, C07C51/235, C07C59/01, C07C67/39, C07C69/653, C12P7/18, C12P7/40, C12P7/42, C12P7/62, C07B61/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12P7/24, C07C29/141, C07C31/20, C07C45/65, C07C47/22, C07C51/235, C07C59/01, C07C67/39, C07C69/653, C12P7/18, C12P7/40, C12P7/42, C12P7/62, C07B61/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	Vancauwenberge, J.E. et al., "Bacterial conversion of glycerol to beta-hydroxypropionaldehyde" Appl. Environ. Microbiol., (1990), Vol. 56, No. 2, pp. 329-332, 特にFig. 4参照	<u>1-3</u> 4-8
<u>X</u> Y	Slininger, P.J. et al., "Optimizing aerobic conversion of glycerol to 3-hydroxypropionaldehyde" Appl. Environ. Microbiol., (1985), Vol. 50, No. 6, pp. 1444-1450, 特にFig. 3, Table 2参照	<u>1-3</u> 4-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25. 11. 2004

国際調査報告の発送日

14.12.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新留 豊

4 B

9 6 3 9

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Slininger, P.J. et al., "Production of 3-Hydroxypropionaldehyde from Glycerol" Appl. Environ. Microbiol., (1983), Vol.46, No.1, pp.62-67, 特にFig.1,2参照	1-8
Y	JP 5-213800 A (Degussa AG), 1993.08.24, & CA 2079655 A & EP 535565 A1 & DE 4132663 A & AU 2609692 A & BR 9203789 A & US 5364984 A	4
Y	JP 2000-154164 A (三井化学株式会社) , 2000.06.06, (ファミリーなし)	8
Y	Skraly, F.A. et al., "Construction and Characterization of a 1,3-Propanediol Operon" Appl. Environ. Microbiol., (1998), Vol.64, No.1, pp.98-105	1-8
Y	Tobimatsu, T. et al., "Identification and Expression of the Genes Encoding a Reactivating Factor for Adenosylcobalamin-Dependent Glycerol Dehydratase" J. Bacteriol., (1999), Vol.181, pp.4110-4113	1-8

## 第I欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第1ページの1. bの続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ

☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット

☐ 書面

☒ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期

☒ 出願時の国際出願に含まれる

☐ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☐ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見: